

На правах рукописи



МЕДВЕДЕВА Наталья Розыевна

**ХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ВОЗМОЖНЫХ
ПРЕВРАЩЕНИЙ *in vivo* ПРОТИВОВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА
«ТРИАЗАВИРИН»**

02.00.03 – Органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Екатеринбург – 2014

Работа выполнена на кафедре органической химии Химико-технологического института
ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России
Б.Н. Ельцина»

Научный руководитель –

доктор химических наук, доцент
Уломский Евгений Нарциссович

Официальные оппоненты:

Бутин Александр Валерианович,
доктор химических наук, профессор,
ФГБОУ ВПО «Пермский государственный
национальный исследовательский
университет», профессор кафедры
органической химии;

Фисюк Александр Семенович,
доктор химических наук, профессор,
ФГБОУ ВПО «Омский государственный
университет им. Ф.М. Достоевского»,
заведующий кафедрой органической
химии

Ведущая организация:

ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский
федеральный университет»

Защита состоится «19» января 2015 г. в 15:00 ч на заседании диссертационного совета Д 212.285.08 на базе ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» по адресу: 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира 19, ауд. И-420 (зал Ученого совета).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», <http://dissovet.science.urfu.ru/news2/>

Автореферат разослан _____ 2014 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат химических наук, с.н.с.



Поспелова Татьяна Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Актуальность создания новых противовирусных средств обусловлена совместным действием таких постоянно действующих факторов, как распространение социально значимых, особо опасных инфекций, а также появление патогенных вирусных штаммов, устойчивых к действию существующих лекарственных средств. Совместными усилиями Уральского федерального университета, Института органического синтеза УрО РАН и Института гриппа МЗ РФ создан новый противовирусный препарат «Триазавирин» (натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она, дигидрат), проявляющий высокую активность, широкий спектр действия и низкую токсичность. «Триазавирин» и его аналоги обладают высокой эффективностью в опытах *in vivo* и пониженной активностью в экспериментах на клеточных культурах, что позволяет предположить противовирусное действие не самого «Триазавирина», а продуктов его превращений в организме. Одним из способов выявления таких превращений является прогнозирование возможных продуктов модификаций соединений, химический синтез моделей, исследование противовирусного действия и выявление их в биологических объектах.

Цели и задачи исследования:

- Определение влияния молекулярных фрагментов 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов – «Триазавирина» и его структурных аналогов – на противовирусное действие.
- Химическое моделирование возможных процессов превращений «Триазавирина» в организме и прогнозирование продуктов реакций (метаболитов).
- Разработка методов синтеза новых 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов – возможных активных метаболитов и их структурных аналогов.
- Поиск новых противовирусных соединений в ряду исследуемых 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов.

Научная новизна работы:

- Разработаны методы синтеза новых 2-Р-6-фтор-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов.
- Разработан альтернативный метод синтеза «Триазавирина» и его гомологов, заключающийся в диазотировании иминотиоуразола, последующем азосочетании – циклизации с получением динатриевой соли 2-меркапто-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она и дальнейшем ее алкилировании галоидными алкилами, приводящем к целевым натриевым солям 2-алкилсульфанил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов.
- Сформулирована концепция возможных превращений «Триазавирина» в организме и предложен план структурных модификаций молекулы препарата, включающий 6 основных направлений: реакции центров С-2, С-6 и С-7 с нуклеофильными фрагментами белков, алкилирование атома N-4, моделирующее процессы гликозилирования, восстановление нитрогруппы и окисление алкилсульфанильной группы.

Автор выражает благодарность академику О.Н. Чупахину, академику О.И. Киселеву и чл.-корр. РАН В.Л. Русинову за постоянное внимание и ценные советы, а также сотрудникам кафедры органической химии УрФУ, ИОС УрОРАН и ФБГУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ, принявшим участие в работе

- В соответствии с планом структурных модификаций «Триазавирина» исследована реакция окисления в качестве модели действия оксидаз и разработаны методы синтеза 6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов, содержащих в триазольном цикле сульфоксидный и сульфонильный фрагменты.

- Исследованы реакции замещения сульфонильного фрагмента в 2-метилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-оне биогенными S-нуклеофилами: цистеамином, *L*-цистеином, глутатионом.

- Разработаны методы N-алкилирования 2-R-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов в качестве моделей процессов N-гликозилирования и для использования в виде защитных групп.

- Разработаны методы замещения нитрогруппы в 2-R-4-R'-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онах S- и N-нуклеофилами с образованием 2-R-6-амино- и 6-алкилсульфанил-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов.

- Установлено ингибирующее действие «Триазавирина» на протеиндисульфидизомеразу.

- Впервые выявлено влияние молекулярных фрагментов «Триазавирина» и его структурных аналогов на их противовирусное действие.

Практическая значимость исследования

Установлены молекулярные фрагменты «Триазавирина», необходимые для противовирусной активности препарата, к которым относятся нитрогруппа триазинового фрагмента и алкилсульфанильный фрагмент в триазольном цикле.

Выявлены соединения – структурные аналоги «Триазавирина», проявляющие высокую противовирусную активность, в отношении которых получено 4 патента РФ на изобретение.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 2 статьи и получены 4 патента РФ на изобретение. Результаты работы с опубликованием тезисов доложены на конференциях всероссийского и международного уровней: XI Молодежной школе-конференции по органической химии (Екатеринбург, 2008); XII Молодежной школе-конференции по органической химии (Иваново, 2009); 16th European Symposium on Organic Chemistry (Prague, Czech Republic, 2009); XIII Молодежной школе-конференции «Актуальные проблемы органической химии» (Новосибирск, 2010); 18th International Conference on Organic Synthesis (Bergen, Norway, 2010); XIV Молодежной школе-конференции по органической химии (Екатеринбург, 2011); XV Молодежной школе-конференции по органической химии (Уфа, 2012); Всероссийской конференции «Органический синтез: химия и технология» (Екатеринбург, 2012); IX Всероссийской конференции «Химия и медицина» с молодежной научной школой по органической химии (Уфа, 2013), 18th European Symposium on Organic Chemistry (Marseille, France, 2013); Уральском научном форуме по органической химии (Екатеринбург, 2014).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 161 странице машинописного текста и состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и приложения. Работа содержит 107 ссылок на литературные источники, 27 таблиц и 19 рисунков.

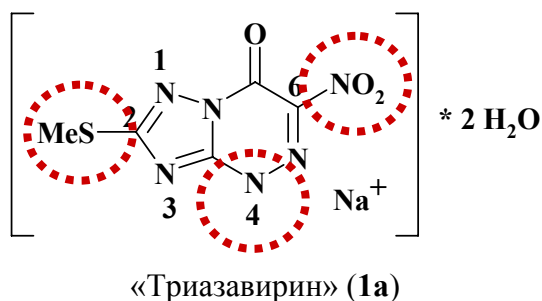
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Литературный обзор посвящен различным аспектам биологического действия азо-ло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов, где рассмотрена активность соединений в отношении различных заболеваний и объекты молекулярно-биологического действия.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФРАГМЕНТОВ НА ПРОТИВОВИРУСНУЮ АКТИВНОСТЬ «ТРИАЗАВИРИНА» И ЕГО АНАЛОГОВ

Для выявления структурных фрагментов лекарственного препарата, существенных для его биологического действия, необходимы соединения - аналоги, в которых одна или несколько функциональных групп исходной структуры заменены другими или модифицированы. Исследования активности соединений в исследуемом ряду позволяют определить молекулярные фрагменты, определяющие действие базового соединения.

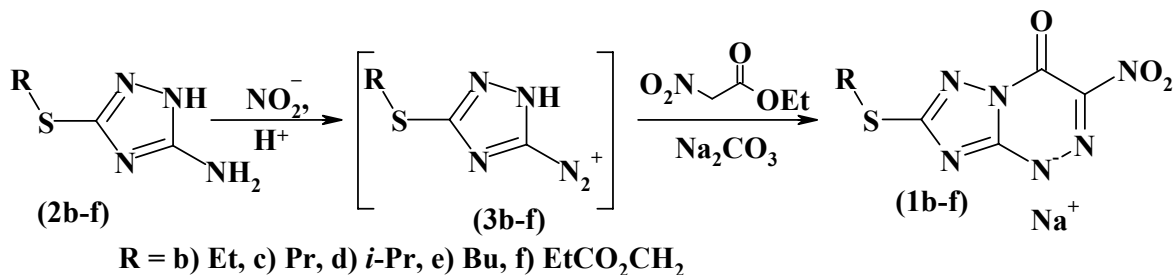


Молекула «Триазавирина» содержит 7 атомов обода гетероциклической структуры, мостиковый атом N(7a) и три функциональные группы: C(2)-SMe, C(6)-NO₂ и C(7)=O. В работе рассмотрены структурные модификации, затрагивающие положения C(2), C(6) и N(4) в молекуле 1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина.

1.1. СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГОМОЛОГОВ ТРИАЗАВИРИНА

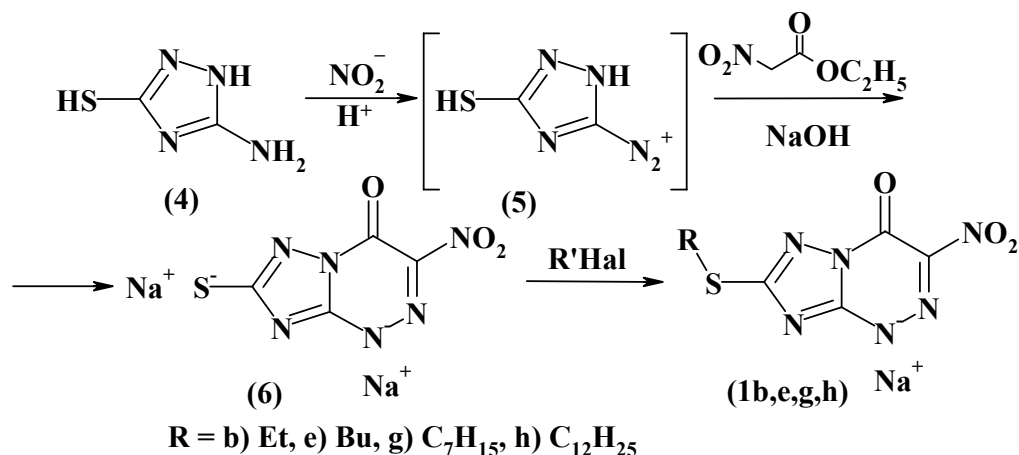
Исследование влияния метилсульфанильной группы на противовирусное действие «Триазавирина» в первом аспекте предполагает установление роли метилтиогруппы группы.

Первым этапом исследования стала разработка методов синтеза 2-алкилсульфанил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов. Метод синтеза, разработанный для «Триазавирина», оказался применим и для ближайших гомологов. Так, взаимодействие (5-амино-1,2,4-триазол-3-ил)дiazония (3) с этилнитроацетатом в присутствии карбоната натрия приводит к образованию 2-алкилсульфанил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов (1b-f) с выходами 49-69 %.



Однако применимость такого способа синтеза ограничивается низшими членами ряда (C₂-C₄, 1b-f). Для более высоких гомологов выходы продуктов не превышают 10 %, что обусловлено низкой растворимостью соответствующих 3-алкилсульфанил-5-амино-1,2,4-триазолов (2) в реакционной среде.

В качестве альтернативного пути синтеза 2-алкилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов (**1**) был разработан метод с использованием иминотиоуразола (**4**) в качестве исходного соединения. Синтетическая схема включает три стадии: диазотирование иминотиоуразола, азосочетание и циклизацию с образованием динатриевой соли 2-тио-6-нитро-1,2,4-триазоло [5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-она (**6**) и последующее ее алкилирование с образованием целевых продуктов (**1**).



Таким образом, на первом этапе исследования разработаны альтернативные методы синтеза гомологов и ближайших структурных аналогов «Триазавирина» - 2-алкилсульфанил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов.

Данные биологической активности некоторых производных «Триазавирина» представлены в таблице 1. Максимальные переносимые концентрации соединений определяли с помощью МТТ-теста в культуре клеток Vero.

Таблица 1. Данные противовирусной активности гомологов «Триазавирина» *in vitro*

№	R	МТД, мкг/мл	Противовирусная активность, С, мкг/мл (EC ₅₀ , lg)
6	Na⁺	1000	250 (1,0) ^a
1b	Et	1000	250 (1,0) ^a
1c	Pr	1000	100 (1,0) ^{a,b}
1e	Bu	1000	100 (0) ^{a,b}
1g	C₇H₁₅	<40	0
1h	C₁₂H₂₅	<40	0

a – вирус А/Виктория/35/72 А(Н3N2)

b - вирус А/PR/8/34

Как видно из таблицы 1, низшие алкилтриазолотриазины как и «Триазавирин» обладают невысокой противовирусной активностью, а при переходе к высшим представителям ряда активность исчезает, что можно объяснить их гидрофобностью, а также резко возрастает цитотоксичность соединений.

Стоит также отметить, что при увеличении длины углеводородной цепи при атоме серы (C₂-C₄) противовирусное действие гомологов «Триазавирина» в отношении некоторых вирусов возрастает (таблицы 2 и 3) по сравнению с активностью препарата.

Таблица 2. Сравнение противовирусной активности «Триазавирина» (**1a**) и соединения (**1b**) *in vitro*

№	Доза, мкг/мл	Вирус Западного Нила		Вирус ТОРС		Вируса гриппа H5N1	
		Δ lg	КИ, %	Δ lg	КИ, %	Δ lg	КИ, %
1a	100	0	0	0.1	18.8	1.5	90
1b	100	0.5	68.8	0.8	84.4	2.7	99.8

Таблица 3. Противогерпетическая активность соединений (**1a,c,e**) *in vitro*

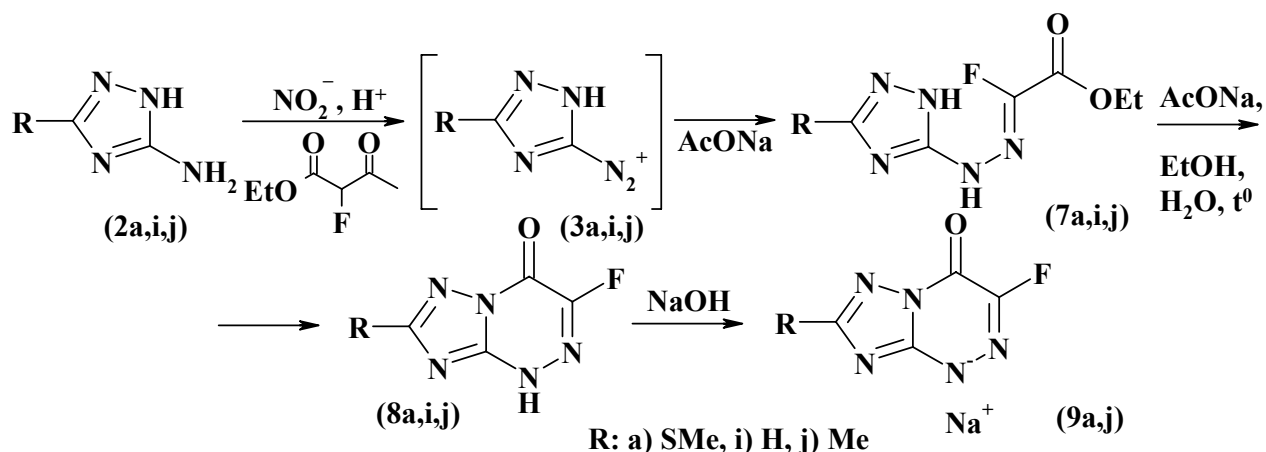
№	Доза, мкг/мл	Концентрация ВПГ-1 lg (ТЦД ₅₀)/мл
1a	1000	60 %
1c	500	0 %
1e	500	0 %

Из данных, приведенных в таблице 3, видно, что «Триазавирин» малоактивен в отношении вируса простого герпеса (ВПГ-1) при концентрации вируса 3 lg (ТЦД₅₀)/мл даже в максимально переносимой концентрации (1000 мкг/мл). В то же время, соединения (**1c,e**) в меньшей концентрации (500 мкг/мл) полностью подавляют цитопатическое действие вируса простого герпеса (ВПГ-1), то есть являются более активными противовирусными соединениями по сравнению с «Триазавирином».

1.2. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ СИНТЕЗА 2-R-6-ФТОР-1,2,4-ТРИАЗОЛО[5,1-*c*][1,2,4]ТРИАЗИН-7-ОНОВ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Второй функциональной группой, которая может определять биологические свойства препарата «Триазавирин», является нитрогруппа в шестом положении молекулы. Для определения влияния этой функциональной группы на противовирусную активность нами были получены 6-фтор-1,2,4-триазолотриазины, отличающиеся от «Триазавирина» наличием атома фтора вместо нитрогруппы.

Синтез 6-фтор-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-онов (**8**) был осуществлен с использованием реакции Яппа-Клингеманна - азосочетанием солей 1,2,4-триазилил-3-диазония (**4a,i,j**) с этил 2-фторацетатом, с последующими дезацетилированием и циклизацией. Собственно алкилфторацетаты не вступают в реакции азосочетания из-за пониженной СН-кислотности, поэтому нами был использован метод активации фторсодержащего синтона ацетильной группой, легко уходящей в условиях азосочетания. Стадия азосочетания протекает с образованием 1,2,4-триазилилгидразонов этилового эфира фторглиоксалевого кислоты (**7**) в присутствии ацетата натрия. Удобным методом превращения фторсодержащих гидразонов (**7**) в 6-фтор-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7-оны (**8**) оказалось кипячение в водно-спиртовом растворе ацетата натрия.



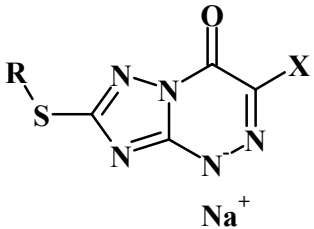
Исследования биологического действия соединений (**8** и **9**) *in vitro* проводились на первичной культуре клеток почек собаки (MDCK). Для оценки противовирусной активности препаратов использовали референс-вирус А(Н1N1) А/Брисбен/59/07. Данный штамм обладает достаточной гемагглютинирующей (1:128) и инфекционной активностью (6,5 lg ИД 50/20 мкл).

Как показали исследования, «Триазавирин» малоактивен в отношении вируса гриппа А(Н1N1) А/Брисбен/59/07, как и 6-фторпроизводные в кислотной форме (**8a,i,j**). В то же время, натриевая соль 2-метил-6-фтортриазолотриазина (**9j**) обладает умеренной противовирусной активностью (1,5 lg при рабочей концентрации 50 мкг/мл) при токсичности, соизмеримой с токсичностью «Триазавирина» (1000 мкг/мл).

1.3. ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ *in vivo* «ТРИАЗАВИРИНА» И ЕГО АНАЛОГОВ

Сравнительный анализ противовирусных свойств «Триазавирина» и его новых и уже известных аналогов в экспериментах *in vivo* позволяет оценить роль фармакофорных групп на биологическую активность исследуемых триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов.

Таблица 4. Данные противовирусной активности «Триазавирина» и его аналогов *in vivo*

	Противовирусное действие (эффективность, %) Грипп А/California/07/09 (H1N1)	
	R	X
	SMe	NO ₂
	H	NO ₂
	Me	NO ₂
	SMe	F
	SMe	Cl
	Тамифлю	

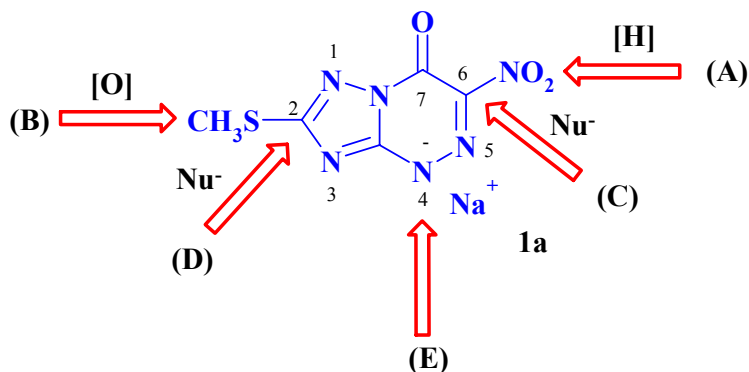
Полученные данные однозначно показывают, что для достижения наибольшей биологической эффективности в отношении вируса гриппа необходимо одновременное присутствие и нитро-, и метилсульфанильной группы. То есть обе функциональные группы существенно влияют на активность препарата и участвуют в его метаболических превращениях.

Таким образом, впервые были получены аналоги «Триазавирина», содержащие в шестом положении атом фтора, был синтезирован ряд гомологов препарата с различной длиной алкильного фрагмента при атоме серы для определения влияния метилтио- и нит-

рогрупп на противовирусную активность. На основании исследования взаимосвязи «структура-активность» в «Триазавирине» можно утверждать, что наличие метилтиогруппы и нитрогруппы является существенным для активности «Триазавирина» в отношении вируса гриппа.

2. МОДЕЛИРОВАНИЕ ВОЗМОЖНЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ ПРЕПАРАТА «ТРИАЗАВИРИН»

Исходя из молекулярной структуры «Триазавирина» (**1a**) и изучения химических свойств 6-нитроазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов можно предположить различные варианты их превращений в организме.

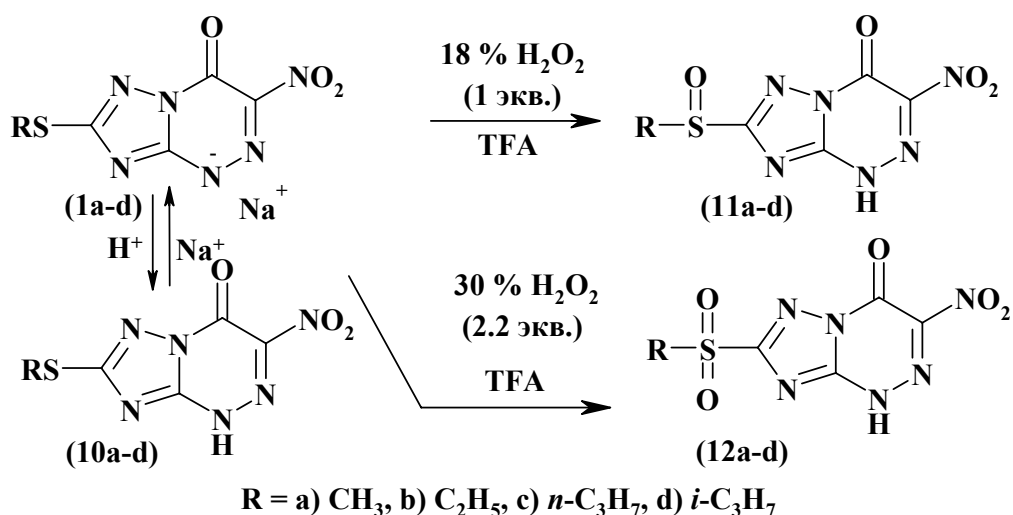


Так, редокс-превращения включают восстановление нитрогруппы под действием редуктаз (направление **A**), окисление алкилсульфанильного фрагмента под действием оксидаз (направление **B**) и их дальнейшие превращения. Участие трансфераз при действии биогенных N- и S-нуклеофилов, как, например, как лизин, аргинин, цистеин способно приводить к замещению алкилтио- или нитрогрупп (направления **C**, **D**). Возможно также алкилирование и рибозилирование по атому N-4 (направление **E**).

2.1. ОКИСЛЕНИЕ АЛКИЛСУЛЬФАНИЛЬНОЙ ГРУППЫ «ТРИАЗАВИРИНА» И ЕГО ГОМОЛОГОВ (НАПРАВЛЕНИЕ В). БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОДУКТОВ

Возможность окисления «Триазавирина» и его гомологов (**1**) обусловлена присутствием в составе молекулы атома S(2), способного к превращениям типа $S^{-2} \rightarrow S^{-0} \rightarrow S^{+2}$.

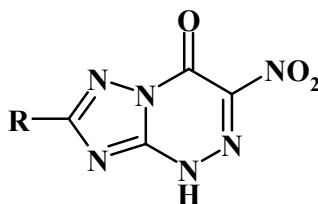
Окисление алкилтиогрупп соединений (**1**) может происходить уже на ранней стадии вирусного инфицирования, так как происходит образование химически активных элементов (O^{\cdot} , NO^{\cdot} , H_2O_2 , $ONOO^{\cdot}$, HO^{\cdot}), что позволяет предположить участие оксидаз с образованием сульфоксидов (S^{-0}) и сульфонов (S^{+2}). Действительно, оказалось, что такое окисление протекает легко. При обработке соединений (**1a-d**) или (**10a-d**) эквимольным количеством 18 % H_2O_2 в трифторуксусной кислоте получены сульфоксиды (**11a-d**). Дальнейшее окисление до соответствующих сульфонов (**12a-d**) с выходами 62-71% осуществлено постепенным прибавлением избытка 2,2 эквивалента 30% H_2O_2 к суспензии 2-алкилтио-1,2,4-триазоло[5,1-с]триазинов (**1a-d**) в трифторуксусной кислоте при комнатной температуре.



Представленные реакции моделируют возможные превращения «Триазавирина» и его производных под действием активных форм кислорода, включая H_2O_2 .

Исследованиями установлено умеренное действие сульфоксидов (11) и сульфонов (12) – продуктов окисления «Триазавирина» и его гомологов в отношении вирусов гриппа типа А(Н1N1) А/Puerto Rico/8/34 и А(Н3N2) А/Victoria /35/72 в пределах 1 лг ТЦД. Результаты биологических испытаний продуктов S-окисления представлены в таблице 5.

Таблица 5. Противовирусная активность соединений (11) и (12) *in vitro*



№	R	МТД, мкг/мл	Концен- трация, мкг/мл	Противовирусная активность (кратность сниже- ния репродукции, lg)	
				А(Н1N1) А/Puerto Rico/8/34	А(Н3N2)А/Victoria /35/72
11a	Me-S(O)	>200	100	1,0	1,0
11b	Et-S(O)	>200	100	0,5	0,5
11c	n-Pr-S(O)	>200	100	1,0	1,0
11d	i-Pr-S(O)	>200	100	1,0	1,0
12a	Me-S(O ₂)	>200	100	0,0	0,0
12b	Et-S(O ₂)	>200	100	0,5	0,5
12c	n-Pr-S(O ₂)	>200	100	0,0	0,0
12d	i-Pr-S(O ₂)	>200	100	1,0	1,0

Как видно из данных, приведенных в таблице 5, S-окисление молекулы «Триазавирин» не вызывает существенных изменений его противовирусной активности в опытах *in vitro*. Но такие метаболические модификации могут явиться проявлением частичных антиоксидантных свойств.

2.2. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ «ТРИАЗАВИРИНА» С ГЕМАГГЛЮТИНИНОМ И НЕЙРАМИНИДАЗОЙ ВИРУСА ГРИППА А/CALIFORNIA/04/2009(Н1N1)

Компьютерное моделирование и исследование связывания «Триазавирин» с гемагглютинином методом поверхностного плазмонного резонанса было проведено совместно с ФБГУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения РФ, автор выражает благодарность за помощь В.В. Егорову и А.В. Васину.

Для виртуального моделирования взаимодействия «Триазавирина» с гемагглютинином и нейраминидазой использовали структуры белков из базы данных PDB (3LZG (H1) и 3T16 (N1) соответственно), и структуру «Триазавирина», оптимизированную в программе HyperChem 8.0 (Trial Version). Для проведения докинга использовали серверную версию программы Hex (<http://hexserver.loria.fr/>) со стандартными параметрами. Моделирование проводили с учётом электростатических взаимодействий, рассматривали 500 наилучших положений лиганда. Для анализа контактов белков с молекулами лиганда использовали программу RasMol.

Моделирование взаимодействие (1a) с нейраминидазой вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1) показало, что все сайты связывания с «Триазавирином» находятся на поверхности молекулы белка вдали от аминокислотных остатков, образующих ферментативный центр нейраминидазы, таким образом возможно исключить ингибирование этого белка препаратом как один вариантов его метаболизма.

По результатам проведенного виртуального моделирования в молекуле гемагглю-
тини́на было обнаружено 5 потенциальных сайтов взаимодействия с «Триазавирином». Первичная последовательность гемагглютини́на вируса гриппа A/California/04/2009 (H1N1), в которой отмечены аминокислотные остатки, потенциально участвующие в ко-
ординации TZV, представлена на рисунке 1.

Influenza A virus A/California/04/2009(H1N1) (Gen Bank ac.no. ACP41105)

1 MKAILVLLYTFATANADTLICIGYHANNSTDVTDVLEKNVTVTHSVNLLLEDKHNGKL **C**
61 **L****RGV**APL**HLGK**GNIA**GL**ILGN**PE****SL**STASS**SY**IVET**SS**DNNGTCYPGDFIDY**LE**IRE
21 QLS**SV****S**FERFE**I**FPK**T**SSWP**NH**DS**NKGV**TAACPHAGAK**S**FY**K**LI**W**LVKKGNSYPKLSK
81 SYINDKGKEVLVLWGIHHPSTADQQSLYQNADTYVFGSSSRYSKKFKPEIAIRPKVRDQ
41 EGRMNYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPYAFAMERN**AG****SGT****I****IS**DPVHD**C****N**TT**CQ****T****FK**
01 **GA**INTSLPFQNIHPIT**IGK**CPKYV__KSTKLRLATGLRNIPSIQS**RGL**FGA**I**AGFIEGGWTG
61 MVDGWYGYHHQNEQSGSYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVIEKMNTQFT**AVGK**EFNHLEKR
21 IENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERTLDYHDSNVKNLYEKVRSQ**L**KNN**A**KEIGNG
81 CFEFYHKCDNTCMESVKNGTYDPKYSEEAKLNREEIDGVKLESTRIYQILAIYSTVASS
41 LVLVVS**L**GAISFWMC**S**NGSLOC**R**ICI

Рисунок 1. Расположение 5 потенциальных сайтов связывания с TZV в соотношении с первичной структурой гемагглютинирина вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1).

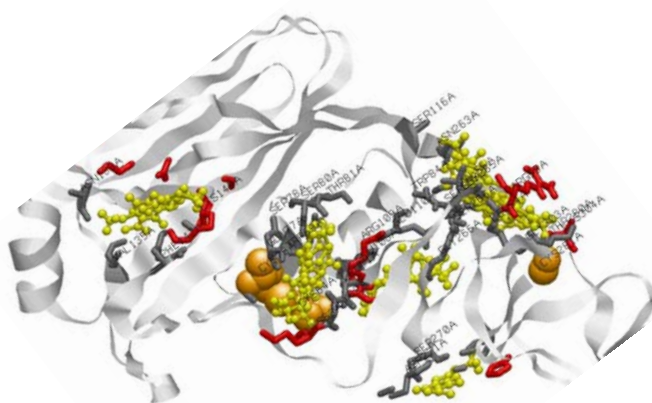


Рисунок 2. Результаты докинга (1a) и гемагглютинина Н1 вируса гриппа.

Пространственная структура гемагглютини́на вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1), в которой отмечены аминокислотные остатки, потенциально участвующие в координации «Триазавирина», представлена на рисунке 2. Анализ данной структуры показывает, что наилучшими по энергии взаимодействия и взаимных расположений молекул гемагглютини́на и «Триазавирина» оказываются сайты, содержащие остатки цистеина, ли-

зина и аргинина. Такое расположение позволяет предположить, что данные фрагменты способны взаимодействовать с «Триазавирином».

Первичное взаимодействие с белками-мишенями для TZV осуществляется, главным образом, за счет отрицательного заряда основной части молекулы TZV, в силу чего при докинге на молекуле гемагглютини́на вируса гриппа в качестве сайтов «посадки» идентифицированы короткие последовательности: CKLRGV (Цис-Лиз-Лей-Арг-Гли-Вал), LGK (Лей-Гли-Лиз), FYKLIW (Фен-Тир-Лиз-Асн-Лей-Изо-Трп) (рис.1). В пользу первичного кислотно-основного связывания TZV и НА свидетельствует обнаруженное методом поверхностного плазмонного резонанса наличие для «Триазавирина» нековалентного и динамического взаимодействия с гемагглютини́ном, вероятно, ионной природы, так как концентрации были подобраны таким образом, чтобы в белке оставались свободные аминокислотные группы. На рисунке 3 представлена сенсограмма данного взаимодействия.

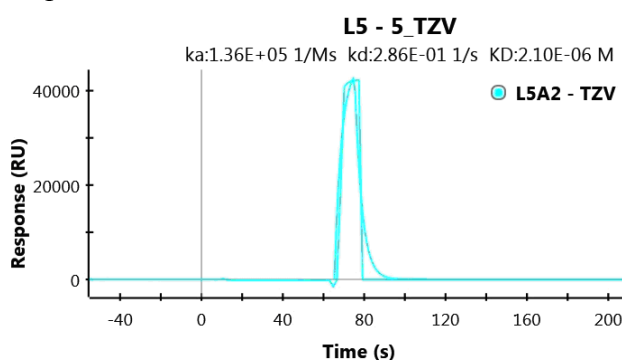


Рисунок 3. Сенсограмма взаимодействия гемагглютини́на подтипа H3N2 и «Триазавирина» (100 нМ)

Вместе с тем, с точки зрения реализации ингибирующей активности на НА, как лекарственной мишени особый интерес представляет домен, более обогащенный остатками цистеина. Это относится к последовательности $^{290}\text{HDCNTTSCNPKGAINTSLPFQNIHPITIGKCPKY}^{323}$. Данный домен содержит остатки цистеинов: $\text{CX}_3\text{CX}_{22}\text{C}$, разобщенных коротким трипептидом с N-конца и 22-членным пептидом в области C-конца полипептидной цепи.

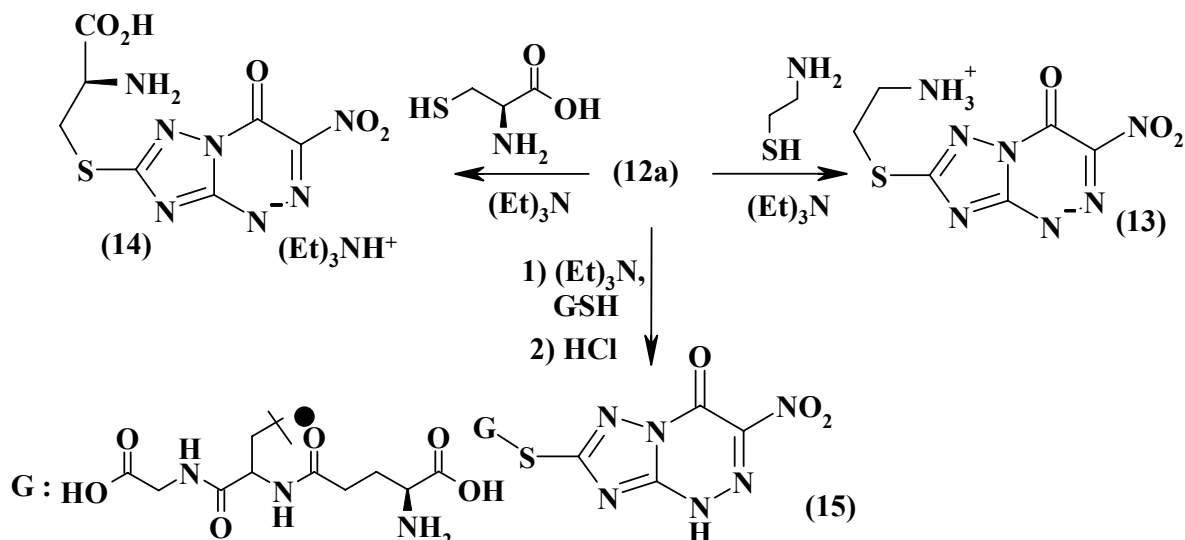
2.3. НУКЛЕОФИЛЬНОЕ ЗАМЕЩЕНИЕ В 2-АЛКИЛСУЛЬФОНИЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛО-[5,1-С][1,2,4]ТРИАЗИН-7-ОНАХ (НАПРАВЛЕНИЕ D) И ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОДУКТОВ

При рассмотрении молекулярной структуры соединения (1) можно предположить его взаимодействие с вирусными белками за счет замещения нитро- или метилсульфанильной групп с N- и S-нуклеофильными остатками, таких, как аминокислоты лизин, аргинин, цистеин в составе различных вирусных белков, например в нейраминидазе или гемагглютанине.

Известно, что алкилсульфонильные фрагменты восприимчивы к реакциям замещения при взаимодействии с нуклеофилами. Что касается поведения нитрогруппы в «Триазавирине», то хорошо известна склонность NO_2 -группы, связанной с ароматическим (гетероароматическим) циклом к замещению под действием нуклеофилов. Таким образом, в структуре 2-алкилсульфонил-1,2,4-триазоло-[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов (12a-d) присутствуют две группировки, склонные к нуклеофильному вытеснению. Эта ситуация представляет интерес для исследования сравнительной реакционной способности легко уходящих групп - CH_3SO_2 - в 1,2,4-триазольном и NO_2 - в 1,2,4-триазиновом циклах в соединениях (12a-d), а также как модель поведения «Триазавирина» в организме. В качестве нуклеофильных реагентов в реакции с 2-метилсульфонил-триазолотриазинном были выбраны цистеин, глутатион и цистеамин, которые можно рассматривать с одной стороны как мо-

дели фрагментов белков, содержащих цистеиновый фрагмент, с другой как биогенные фрагменты, которые могут быть введены в молекулу 1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазины.

Замещение сульфонильного фрагмента в 2-метилсульфонил-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазине (**12a**) под действием цистеина, глутатиона и цистеамина, происходит при кипячении в сухом метаноле в присутствии триэтиламина в течение нескольких дней с образованием веществ (**13-15**) – продуктов замещения метилсульфонильной группы с выходами 41-46%.



Заместить сульфонильный фрагмент сульфоксидов (**11a-d**), в описанных выше условиях не удалось.

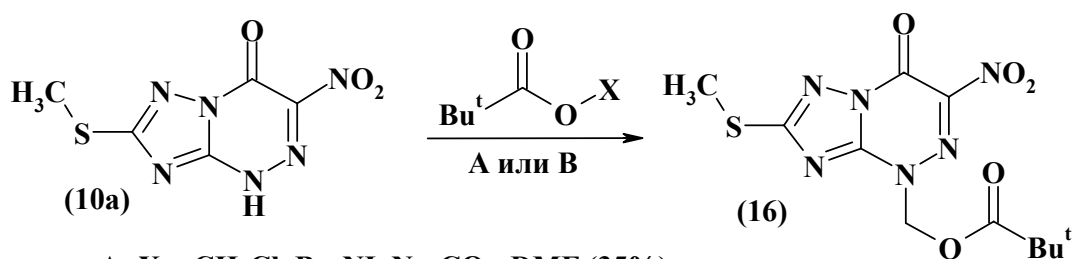
Описанное замещение алкилсульфонильной группы в соединении (**12a**), является аргументами в пользу предположения о возможном участии этого фрагмента в метаболических превращениях «Триазавирина».

2.4. N(4) АЛКИЛИРОВАНИЕ «ТРИАЗАВИРИНА» (НАПРАВЛЕНИЕ F)

Целесообразность рассмотрения модификаций молекулы «Триазавирина» по N-атомам триазолотриазинового цикла обусловлена двумя основными причинами. Прежде всего, известно, что конденсированные азолазины способны вступать в реакции рибозилирования с образованием природных нуклеозидов с последующим ингибированием синтеза ДНК, чем обусловлена их биологическая активность. Таким образом, исследование модификаций «Триазавирина» по направлению E представляется важным с точки зрения получения аналогов неприродных нуклеозидов. С другой стороны, N-алкилирование «Триазавирина» и его аналогов позволяет реализовать замещение нитрогруппы N-нуклеофилами (направление C), невозможное в самих NH-гетероциклах из-за образования солей аммония. Таким образом, направление E представляет интерес и в качестве способа модификации «Триазавирина», и в качестве синтетического приема.

Ранее было установлено, что алкилирование «Триазавирина» (**1a**) галоидными алкилами проходит неселективно и приводит к образованию изомерных продуктов N-алкилирования.

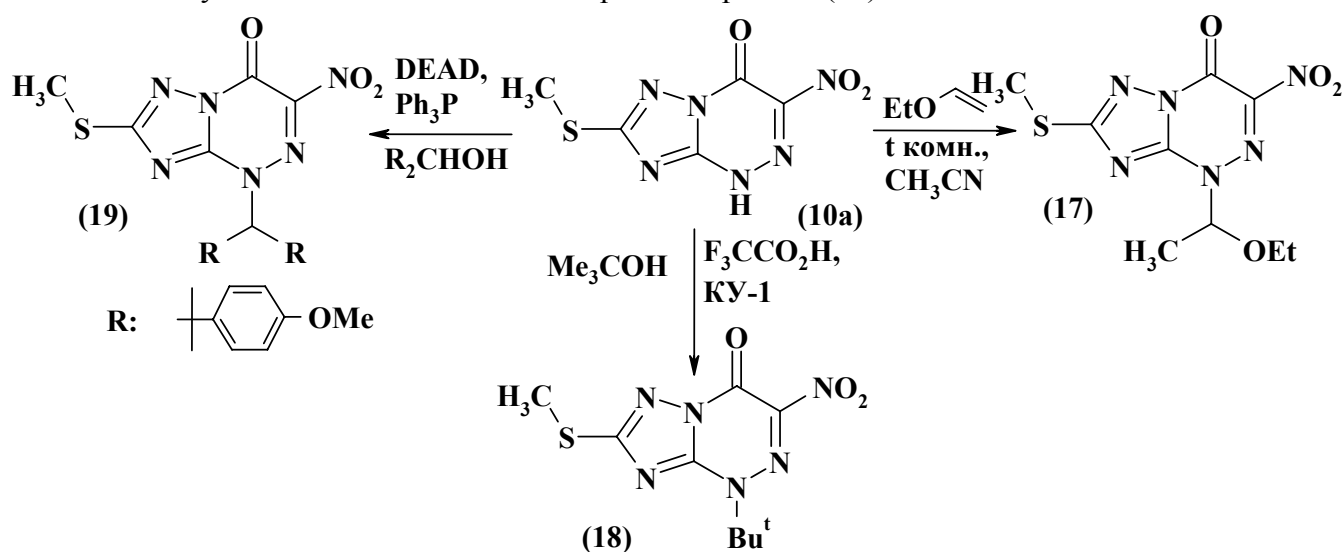
Введение в положение 4 триазолотриазинового цикла пивалоилоксиметильной группы обусловлено возможностью ее применения в качестве защитной группы, а также ее структурной аналогией с гликозидным фрагментом.



A: X = CH₂Cl, Bu₄NI, Na₂CO₃, DMF (35%)

B: (Me)₃CO, ZnCl₂, (H₂CO)_n, t = 140 °C (82%)

Нами были разработаны два метода получения 4-пивалоилоксиметильного производного «Триазавирина», наиболее эффективный из которых заключается во взаимодействии 2-метилсульфанил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она (10a) с пивалевым ангидридом и параформом при 140°C в присутствии хлорида цинка. Данный способ позволяет получить 4-пивалоилоксиметилтриазолотриазин (16) с выходом 82 %.

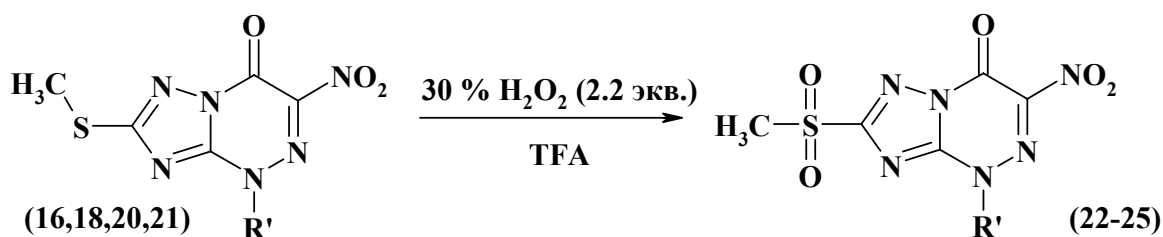


Взаимодействие триазолотриазина (10a) с винилэтиловым эфиром приводит к образованию 4-этоксиметилтриазолотриазина (17). Реакция проводилась в сухом ацетонитриле при комнатной температуре, выход продукта составил 85%. Этоксиметильный фрагмент также известен в качестве защитной группы.

Другим методом введения защитной алкильной группы является алкилирование спиртами в присутствии сильной кислоты. Так, алкилирование *трет*-бутанолом NH-кислоты «Триазавирина» протекает селективно с образованием единственного N(4) – *трет*-бутилированного изомера (18).

Удобным методом региоселективного алкилирования также является реакция Мицунобу. Так, в диоксане в присутствии трифенилфосфина и диэтилазидикарбоксилата была введена бис(4-метоксифенил)метильная группа в N(4) положение триазолотриазина (19) с выходом 74 %.

Для определения приоритетного центра из двух конкурентных направлений реакции нуклеофильного замещения нами были синтезированы производные (22-25). Как и «Триазавирин» и его аналоги, 4-алкил-триазолотриазины легко окисляются до соответствующих сульфонов действием избытка перекиси водорода.

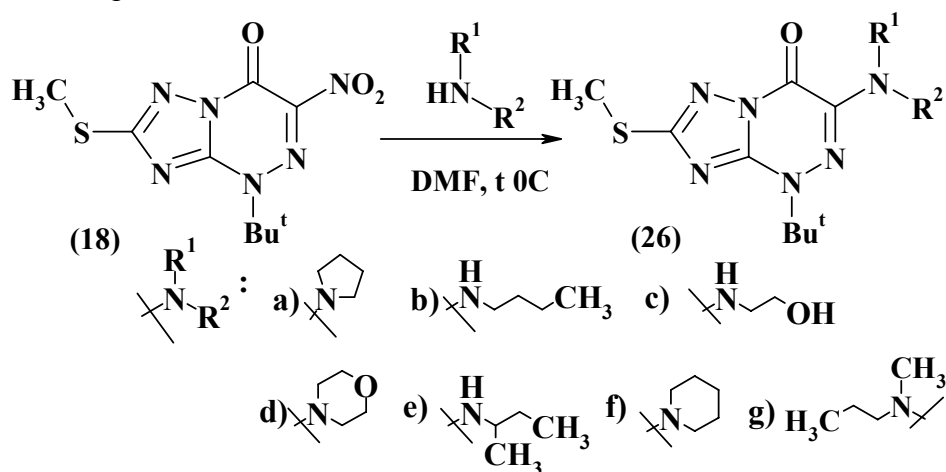


Таким образом, на данном этапе работы нами были разработаны четыре методики алкилирования 6-нитротриазоло[5,1-с][1,2,4]триазины, с помощью которых были синтезированы новые 4-алкилтриазолотриазины. Кроме того, стоит отметить, что бис(4-метоксифенил)метильная, пивалоилоксиметильная и этоксиэтильная группы являются легкоуходящими и могут быть использованы как защитные для блокирования NH протона в 4 положении для облегчения замещения нитрогруппы и последующего удаления защиты. То есть появляется возможность получить продукты замещения самого «Триазавирин», а не только его алкилированных аналогов на S- и N-нулеофилы.

2.5. ЗАМЕЩЕНИЕ НИТРОГРУППЫ В «ТРИАЗАВИРИНЕ» (НАПРАВЛЕНИЕ С)

2.5.1. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С N-НУКЛЕОФИЛАМИ

Следующим аспектом работы стало исследование нуклеофильного замещения нитрогруппы в 4-алкил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онах. Предыдущими исследованиями показано, что 4-алкил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-оны способны к замещению нитрогруппы под действием N-нуклеофилов, однако не всегда эта реакция протекает однозначно. В ходе исследований обнаружено, что 2-метилтио-4-R-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазины, в отличие от триазолотриазина (**1a**) не способны к образованию солей с основаниями, активно взаимодействуют с N-нуклеофилами – первичными, вторичными аминами и циклоалкилиминами.



При взаимодействии 4-трет-бутил-триазоло[5,1-с]триазины (**18**) с N-нуклеофилами наиболее легко реакция проходит с первичными аминами – этаноламином и *n*-бутиламином (60-77 %). В то же время реакция со *втор*-бутиламином, диалкиламинами, а также с циклоалкилиминами требует более жестких условий. Образование продуктов замещения нитрогруппы (**26a-g**) происходит при кипячении реагентов в ДМФА от 2 ч для первичных аминов до 15 часов для вторичных и циклических аминов. Выходы целевых продуктов (**26a-g**) составили 15-77%.

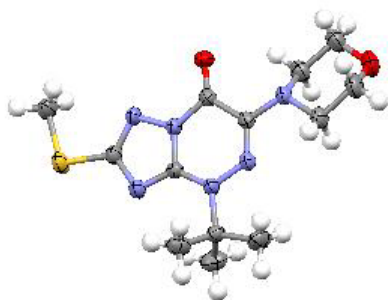
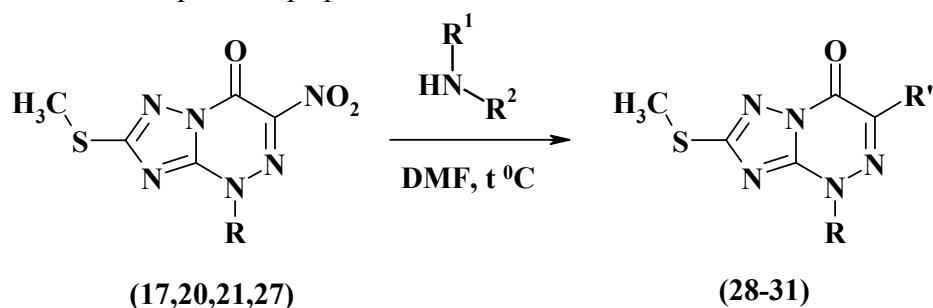


Рисунок 4. Структура 4-*tert*-бутил-6-морфолил-1,2,4-триазоло[5,1-*c*]-1,2,4-триазина (**26d**)

Структурное строение соединения (**26d**) было также подтверждено методом рентгеноструктурного анализа. Структура молекулы приведена на рисунке 4.

Взаимодействием 4-*R*-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов с некоторыми *N*-нуклеофилами был получен ряд соединений (**28-31**). Для проведения данных превращений были использованы те же условия, что и в случае замещения нитрогруппы в 4-*tert*-бутил-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазине: тройной избыток амина в ДМФА при нагревании. Продукты реакции были выделены с помощью колоночной хроматографии.



28a, $R = \text{Me}$, $R' = \text{NHBu}$; **29a**, $R = \text{Et}$, $R' = \text{NHBu}$;

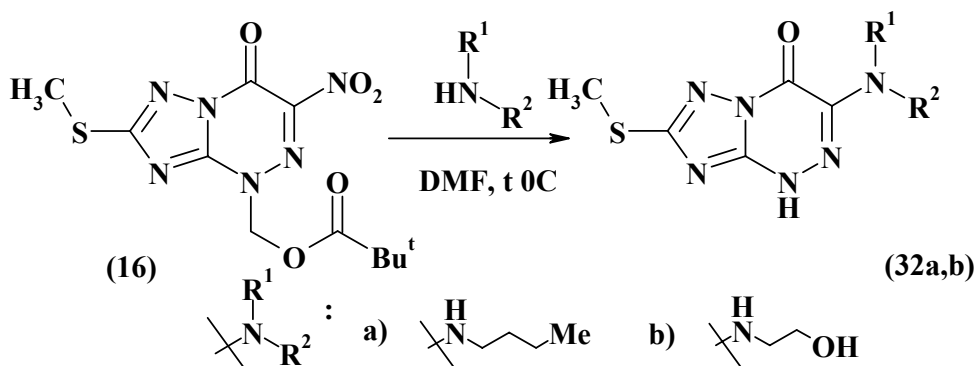
29b, $R = \text{Et}$, $R' = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$;

29c, $R = \text{Et}$, $R' = \text{морфолил}$,

30a, $R = \text{Bn}$, $R' = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$;

31a, $R = \text{H}_3\text{C}-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{O}-\text{Et}$, $R' = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

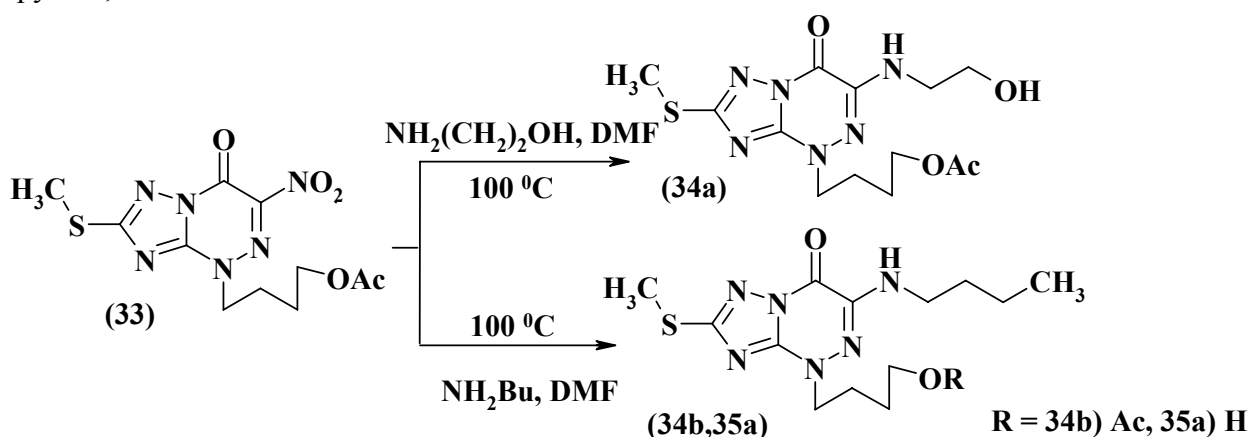
При исследовании взаимодействия 4-пивалоилоксиметил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазина (**16**) с первичными аминами (бутиламин, этаноламин) установлено, что одновременно с замещением нитрогруппы проходит удаление пивалоилоксиметильного фрагмента и образование 6-алкиламинотриазоло[5,1-*c*]триазинов (**32a,b**) с выходами 27-39%.



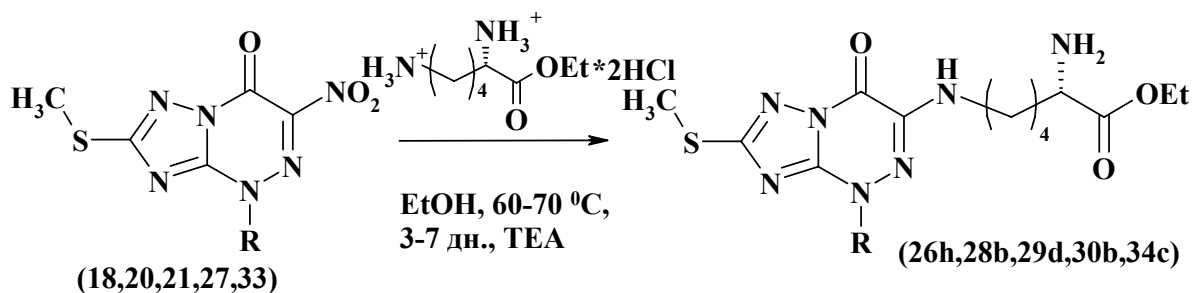
Таким образом, пивалоилоксиметильный фрагмент оказался в условиях реакции эффективной защитной группой, позволяющей реализовать замещение нитрогруппы амином и получить 6-алкиламино-триазолотриазины (**32**), не содержащие алкильную группу при N4-атоме.

В полученном по описанному ранее методу 2-метилтио-4-(4-ацетоксибутил-1)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазин-7(4H)-оне (**33**) также было проведено замещение нитрогруппы на остаток этаноламина и *n*-бутиламина. Реакция была проведена в ДМФА при 100 °С с тройным избытком амина в течение 3 ч.

Взаимодействие соединения (**33**) с этаноламином. идет с получением единственного продукта (**34a**) и с высоким выходом (85%). При замещении бутиламином было выделено два продукта: 6-*n*-бутиламинозамещенный триазолотриазин (**34b**) с выходом 40% и 4-гидроксibuтил-6-бутиламино-триазоло[5,1-*c*]триазин (**35a**) с выходом 35%. Таким образом, одновременно с замещением под действием амина частично проходит гидролиз ацетильной защитной группы, что объясняется характером ацетильной группы как защитной группы, снимаемой основаниями.



Также удалось смоделировать замещение нитрогруппы биогенными N-нуклеофилами. В качестве модельного соединения был выбран этиловый эфир *L*-лизина. Вследствие того, что сам лизин плохо растворяется в органических растворителях, а исходные триазолотриазины, напротив, являются гидрофобными соединениями, нами был использован этиловый эфир лизина.



R : 20,28b) Me; 21,29d) Et; 27,30b) Bn; 18,26h) (CH₃)₃C; 33,34c)

Взаимодействие алкилированных аналогов «Триазавирин» с этиловым эфиром *L*-лизина проводили в абсолютном этаноле и умеренном нагревании (60-70 °С) от трех дней до недели. Выход полученных соединений не превышает 20 %.

Продукт взаимодействия с аргинином, который также содержит концевую аминогруппу, получить в описанных выше условиях не удалось.

В таблице 6 приведены данные биологических испытаний для наиболее активных представителей ряда 6-алкиламино-4-R-триазоло[5,1-*c*][1,2,4]триазинов.

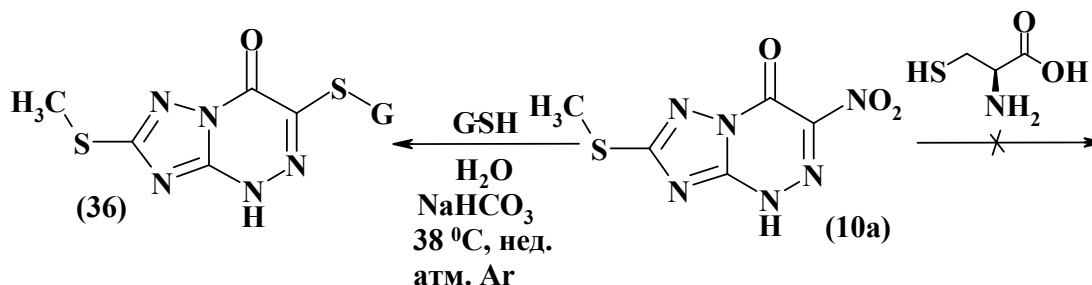
Таблица 6. Противовирусная активность продуктов взаимодействия алкилированных аналогов «Триазавирина» с N-нуклеофилами *in vitro*.

№	МТД, мкг/мл	А/Петербург/16/09 А(Н3N2)		А/Виктория/35/72 А(Н3N2)		А/Петербург/5/09 А(Н1N1)	
		доза, мкг/мл	снижение титра ви- руса(Ig)	доза, мкг/мл	снижение титра ви- руса(Ig)	доза, мкг/мл	снижение титра ви- руса(Ig)
26с	200			100	1,0	100	1,0
28а	>100	100	1,0				
30а	>100	100	1,5				
31а	>100	100	1,0				

Полученные данные позволяют продолжить перспективный поиск биологически активных соединений в ряду 6-алкиламино-4-R-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов, так как соединения (**26с,28а,30а,31а**) проявляют умеренную противовирусную активность.

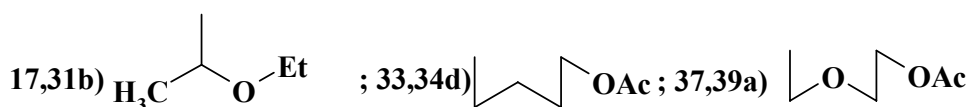
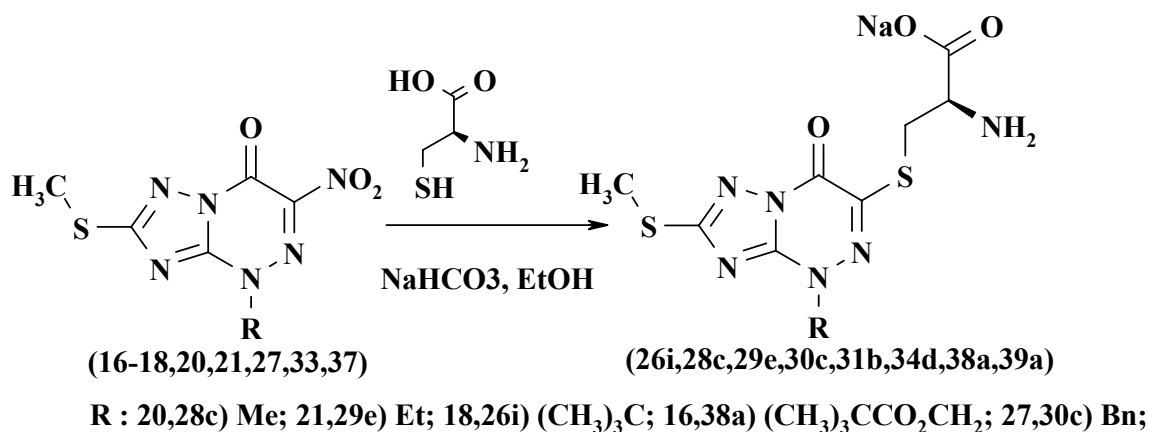
2.5.2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С S-НУКЛЕОФИЛАМИ

Моделирование процесса взаимодействия алкилированных аналогов «Триазавирина» с цистеин-содержащими белками нами было осуществлено на примере цистеина - как ключевой аминокислоты и трипептида глутатиона как доступной модели цистеин-содержащих белков. При взаимодействии соединения (**10а**) с цистеином и глутатионом в температурных условиях, приближенных к температуре человеческого тела – 38°C, а также в атмосфере аргона был получен только продукт нуклеофильного замещения нитрогруппы на глутатион после недельной выдержки реакционной массы в описанных условиях.



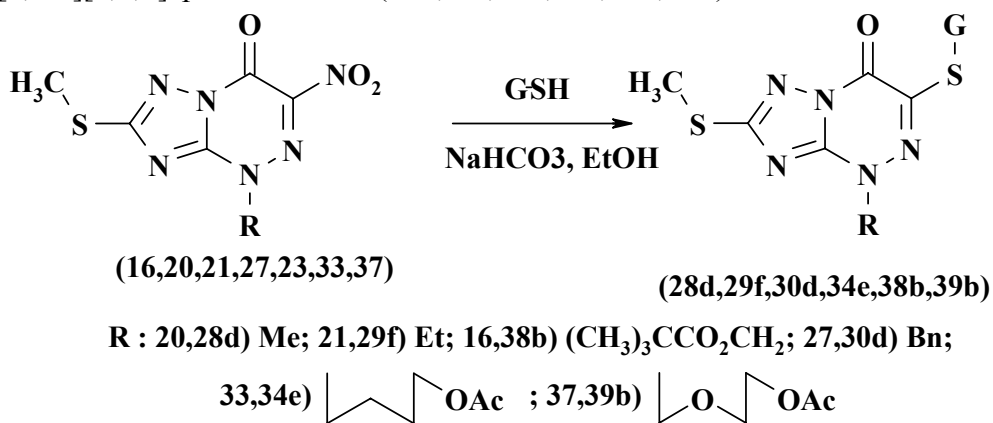
Какого-либо ковалентного взаимодействия «Триазавирина» с цистеином даже после двухнедельного инкубирования обнаружить не удалось даже на ТСХ.

При взаимодействии алкилированных аналогов «Триазавирина» (**16-18,20,21,27,33,37**) с L-цистеином при комнатной температуре в абсолютном этаноле в присутствии гидрокарбоната натрия происходит практически мгновенное замещение нитрогруппы с образованием 2-метилтио-4-R-6-(2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов (**26i,28с,29е,30с,31b,34d,38а,39а**). Реакции протекают как в присутствии 1 эквивалента гидрокарбоната натрия, так и в его отсутствии, при этом получены продукты в солевой либо кислотной формах соответственно.



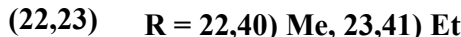
При исследовании противовирусной активности было выявлено, что соединение (**38a**) проявляет высокий уровень противовирусной активности. Так при МТД 177 мкг/ мл и рабочей концентрации 62,5 мкг/ мл происходит снижение титра вируса А/Петербург/16/09 А(Н3N2) на 3.5 lg и вируса А/С Петербург/5/09 А(Н1N1) на 3 lg. Таким образом, введение цистеинового фрагмента в качестве заместителя в молекулу «Триазавирина» (соединение **38a**) приводит к значительному усилению противовирусной активности *in vitro*, что, вероятно, делает эти соединения более близкими по метаболическим свойствам к обмену тиол-содержащих метаболитов в клетках, инфицированных вирусами гриппа.

Также гладко идет замещение нитрогруппы и при взаимодействии соединений (**16, 20, 21, 27, 33, 37**) с более приближенным к цистеинсодержащим белкам трипептидом L-глутатионом. В результате образуются 2-метилтио-4-R-6-(глутатион-S-ил)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-оны (**28d, 29f, 30d, 34e, 38b, 39b**).



Провести реакцию при участии 2-метилтио-4-(*p*-диметокси-дифенил-метил)-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазина (**19**) не удалось ни с цистеином, ни с глутатионом, вероятно, это можно объяснить стерическими затруднениями вследствие большого объема алкильного заместителя.

Из двух возможных конкурентных направлений реакции триазоло-1,2,4-триазин-7-онов (**22, 23**) с цистеином при комнатной температуре также происходит замещение *только* нитрогруппы с сохранением метилсульфонильного фрагмента и образованием соединений (**40, 41**), о чем свидетельствуют данные ¹H ЯМР и ИК-спектроскопии.



Получение 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазинов с цистеиновым фрагментом свидетельствуют о том, что и в физиологических условиях возможен ферментативный катализ таких соединений.

2.5.3. УДАЛЕНИЕ ЗАЩИТНЫХ ГРУПП

Чтобы расширить круг соединений для биологических испытаний нами были проведены реакции по удалению введенных защитных групп в полученных ранее соединениях. Так, 2-метилтио-4-(2-гидроксиэтокс)метил-6-(глутатион-S-ил)-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-он (**42**) содержит моделирующий фуранозильный фрагмент, подобно противовирусному препарату «Ацикловир» был получен при обработке соединения (**39b**) 1N раствором соляной кислоты.



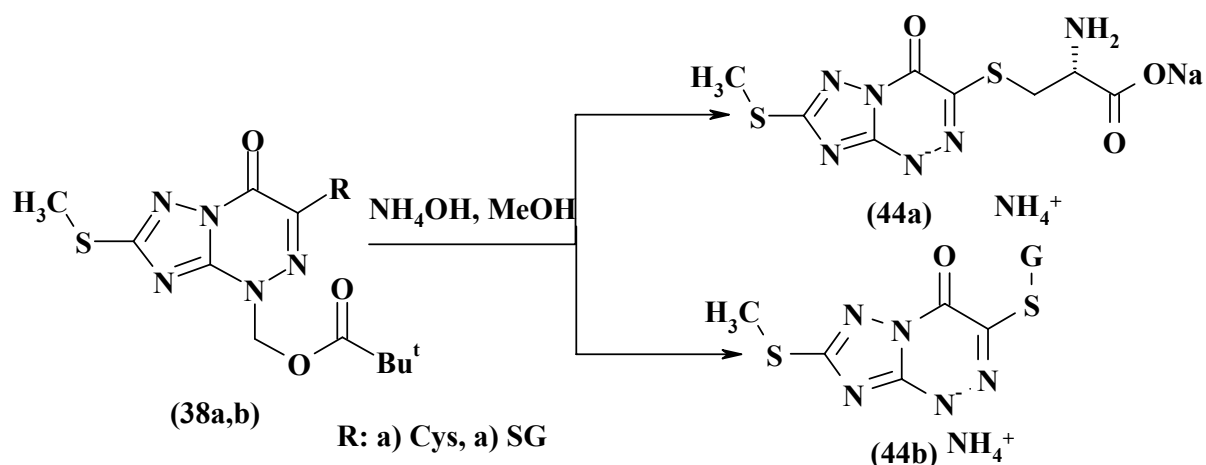
Этоксипропан-2-ильная группа удалена в 1N растворе соляной кислоты при комнатной температуре в течение 72 часов. В результате было получено соединение **(43)** с выходом 53 %.



Рисунок 5. Структура 2-метилтио-6-(2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-1,2,4-триазол[5,1-с]-1,2,4-триазина (**43**)

Строение 2-метилтио-6-(2'-амино-2'-карбоксиэтилтио)-1,2,4-триазол[5,1-с][1,2,4]триазина (**43**) было подтверждено данными рентгеноструктурного анализа, соединение (**43**) представляет собой монохлорид моногидрат. Структура молекулы приведена на рисунке 5.

Пивалоилоксиметильная группа широко используется в качестве защитной, удаляемой в основных условиях.



В результате удаления пивалоилоксиметильной группы в соединениях (38a,b) были получены незамещенные по положению 4 триазолотриазинового цикла цистеин- и глутатионпроизводные (44a,b). Реакции были проведены в растворе аммиака в метаноле при комнатной температуре в течение нескольких часов.

2.6. ВОССТАНОВЛЕНИЕ НИТРОГРУППЫ КАК ПРИЧИНА ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ «ТРИАЗАВИРИНА» (НАПРАВЛЕНИЕ А).

В отношении превращений по типу «А» при изучении фармакокинетики препарата ранее было зафиксировано наличие 2-метилтио-6-амино-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7(4Н)-она, однако противовирусным действием *in vitro* это соединение не обладает. Первоначально считалось, что это обусловлено обычным действием редуктаз, не относящееся к механизму противовирусного действия. Однако оказалось, что «Триазавирин» является ингибитором протеиндисульфидизомеразы – фермента, ответственного за образование и изомеризацию дисульфидных связей в процессе созревания гемагглютини-на.

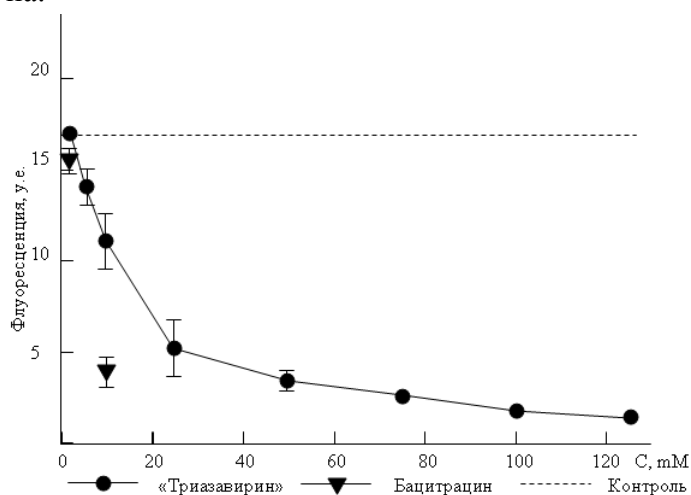


Рисунок 6. Ингибирующее действие «Триазавирина» в отношении ПДИ

Оценка влияния «Триазавирина» на ферментативную активность протеиндисульфидизомеразы (ПДИ) проводилась *in vitro* с использованием набора «PDI Inhibitor Screening Assay Kit» (Abcam, кат. номер ab139480). Набор основан на катализируемом ПДИ восстановлении инсулина в присутствии DTT (дтитотреитол), приводящим к образованию инсулиновых агрегатов, которые связываются с флуорогенным реагентом «PDI Detection Reagent». В качестве ингибитора ПДИ

в наборе используется бацитрацин (ВАС). Из данных, приведенных на рисунке 6 видно, что в концентрации 125 мМ «Триазавирин» ингибирует активность ПДИ на порядок (снижение флуоресценции с 17 до 1,5 у.е.).

Воздействие препарата на протеиндисульфидизомеразу и гемагглютинин можно представить в виде рисунка 7.

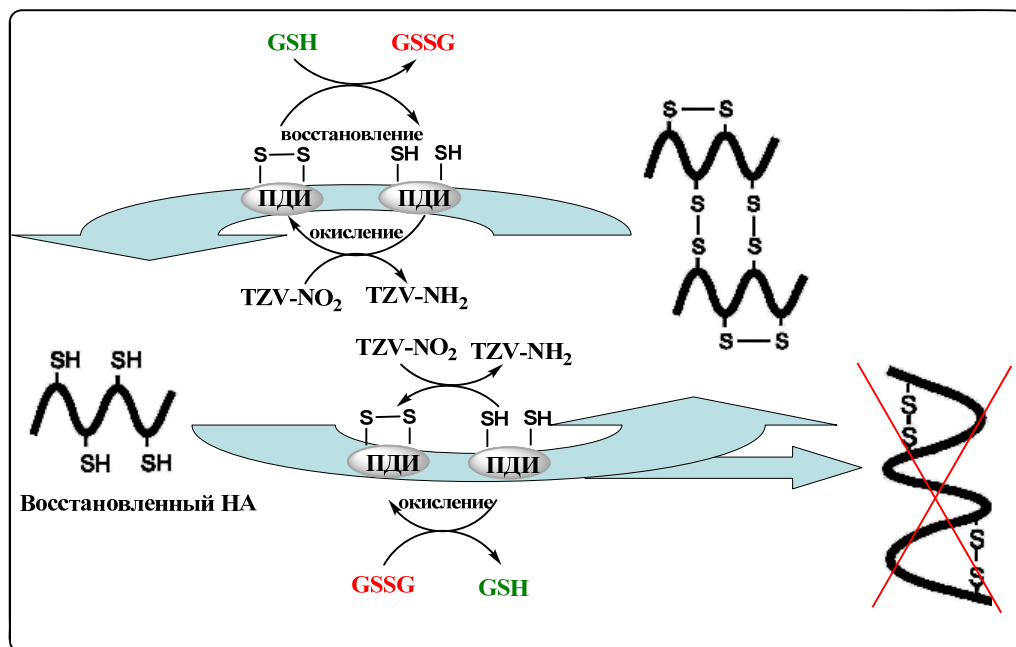


Рисунок 7. Механизм ингибирующего действия «Триазавирина» (TZV) в отношении ПДИ и гемагглютинаина (НА)

В результате восстановительного и окислительного циклов ПДИ катализирует изомеризацию (смещение) дисульфидных связей, обеспечивая переход белка в оптимальную для функционирования конформацию. Действие ингибитора, в данном случае «Триазавирина», приводит к нарушению этого цикла в комплексе ПДИ - гемагглютинин. Одновременно с этим может происходить образование дисульфидных связи между остатками цистеина, которые нарушают структуру белка и приводят как к его инактивации, так и развитию окислительного стресса в клетке, что нарушает жизненный цикл репродукции вируса и может привести к апоптозу (гибели) клеток.

Нарушение изомеризации дисульфидных связей в домене, выделенном на рисунке 8 может иметь наиболее важные последствия в нарушении функциональной активности гемагглютинаина и приводить к его инактивации, так как домен CNTTC является основным докинг-сайтом в молекуле гемагглютинаина, поэтому изомеризация S-S-связей в этом участке имеет принципиальное значение для активности этого белка и инфекционности вируса гриппа.

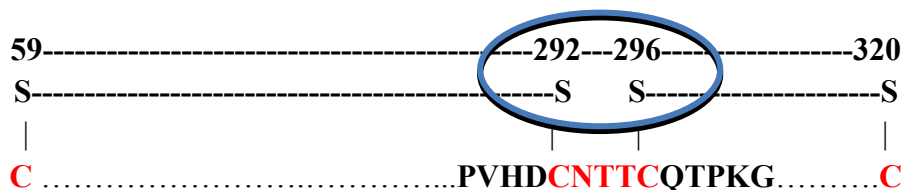


Рисунок 8. Дисульфидные связи в молекуле НА

Доказательством того, что «Триазавирин» способствует образованию и изомеризации S-S связей в молекуле гемагглютинаина являются масс-спектрометрические исследо-

вания, приведенные ниже. В качестве модельных пептидов были выбраны фрагменты гемагглютинаина - HA-I, HA-II и HA-III, имеющие в своей последовательности по два остатка цистеина (табл. 7).

Таблица 7. Последовательность и молекулярная масса модельных пептидов

№	Пептид	Последовательность	М.м.
1	HA-I	DC <u>N</u> TT <u>C</u> Q	783.25
2	HA-II	YGNC <u>N</u> T <u>K</u> CQ	1029.4
3	HA-III	L <u>C</u> KLGGIAPLHLG <u>K</u> CN-амид	1634.9

Была проведена серия кинетических экспериментов по окислению как каждого из этих пептидов по отдельности, так и их смесей, в присутствии «Триазавирина» и в его отсутствии. На рисунке 9 представлены масс-спектры пептида HA-I. Ниже на рисунке 10 представлены фрагменты из этих масс-спектров с изотопным распределением для мономерных и димерных форм HA-I.

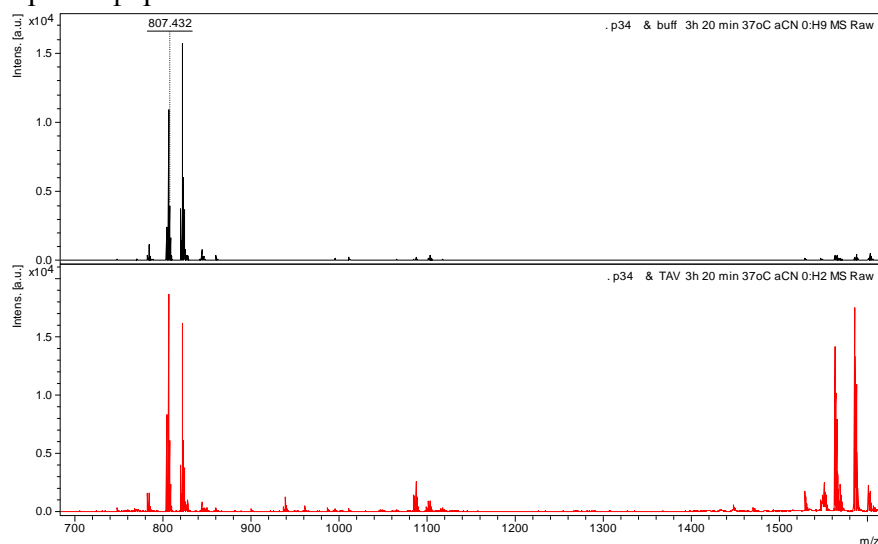


Рисунок 9. MALDI- масс-спектры смесей пептида HA-I в присутствии «Триазавирина» (отмечен красным цветом) и без него (отмечен черным цветом)

Мономерные и димерные формы пептида HA-I регистрируются в виде набора квази-молекулярных ионов с H^+ и с Na^+ . Набор пиков слева соответствует различным ионам мономера пептида HA-I, набор пиков справа – димерам пептида HA-I.

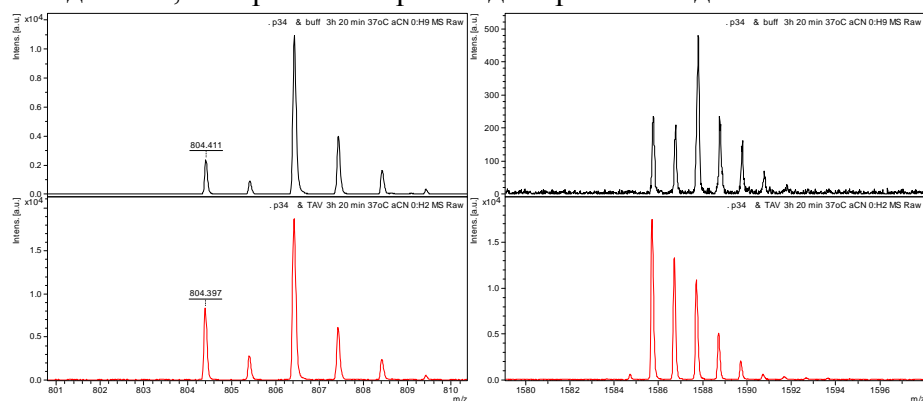


Рисунок 10. Фрагменты MALDI- масс-спектров смесей пептида HA-I в присутствии «Триазавирина» (отмечен красным цветом) и без него (отмечен черным цветом), представленных на рис. 7. Наборы пиков соответствуют мономерной (слева) и димерной (справа) формам пептида HA-I

Из представленных на рисунке 9 и 10 данных для смесей с НА-I, во-первых, однозначно следует, что присутствие «Триазавирина» способствует образованию димерных форм пептида. При этом каждая из форм пептида представлена в виде смеси продуктов с разной степенью окисления (рис. 10). Для мономерных форм ионы с $m/z = 804$ соответствуют пептиду (НА-I + Na^+) с внутримолекулярной S-S связью, а ионы с $m/z = 806$ соответствуют пептиду (НА-I + Na^+) с двумя свободными тиольными группами (-SH). Для димерных форм ионы с $m/z = 1565.7$ соответствуют дипептиду ($2\text{НА-I} + \text{H}^+$) с одной межмолекулярной S-S связью, а ионы с $m/z = 1563.7$ соответствуют пептиду ($2 \text{НА-I} + \text{H}^+$) с двумя межмолекулярными S-S связями. Во-вторых, из сравнения соотношения интенсивностей относящихся к разным степеням окисления тиольных групп, следует, что присутствие «Триазавирина» увеличивает степень окисления для обеих форм пептида. Для мономерной формы – с 16% до 41%, для полностью окисленной формы димера – с 40% до 70%.

Аналогичную картину влияния «Триазавирина» наблюдали для пептида НА-II и НА-III. Увеличивалось количество димерных форм и степень окисления как для мономера, так и для димера. Отметим, что для НА-III наблюдается существенно меньшее образование полностью окисленных форм по сравнению с пептидами НА-I и НА-II. Важно, что при очевидном влиянии «Триазавирина» на окисление тиольных групп во всех пептидах, продуктов ковалентного связывания с «Триазавирином» масс-спектрометрически не зарегистрировано.

Окисление смеси пептидов НА-I и НА-III не является аддитивным результатом окисления каждого из пептидов отдельно. В этом случае мы наблюдаем отсутствие как мономерных, так и димерных форм для НА-I (см. рис. 9). Для этого пептида мы наблюдаем его ковалентное связывание с пептидом НА-III, т.е. образование исключительно гетеродимеров с одной или двумя дисульфидными связями (ионы с $m/z = 2417.6$ и с $m/z = 2415.6$, соответственно). При этом пептид НА-III наряду с образованием гетеродимеров образует моно- и гомодимеры.

Из полученных данных следует, что «Триазавирин» однозначно способствует образованию S-S связей, однако тип продуктов (моно- или димера) определяется свойствами самих пептидов.

Таким образом, действие «Триазавирина», являющегося лигандом и окислителем тиоловых групп в белках, интерферирует с активностью ПДИ и является ингибитором репродукции вирусов, белки которых зависят от каталитической активности ПДИ. Второе важное обстоятельство: нитрогруппы различных природных соединений и лекарственных препаратов становятся более реакционно активны в условиях нитрозильного стресса, то есть генерирования пероксинитрита (ONOO^-). Поэтому активность препарата «Триазавирин» может возрастать в условиях, например развития вирусной пневмонии. Этим объясняется высокий протективный эффект «Триазавирина» при инфекциях, вызванных особо опасными вирусами, быстро вызывающими легочные осложнения.

Таким образом, установлен по крайней мере один способ ингибирующего действия «Триазавирина» на активность гемагглютинаина, участвующего в ключевых стадиях вирусного инфицирования и развития инфекции.

ВЫВОДЫ:

1. Разработаны методы синтеза новых 2-R-6-фтор-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов.
2. Разработан альтернативный метод синтеза «Триазавирина» и его гомологов, заключающийся в синтезе и алкилировании динатриевой соли 2-тио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она.
3. Сформулирована концепция возможных превращений «Триазавирина» в организме.
4. В соответствии с предложенной концепцией разработаны методы синтеза сульфоксидов и сульфонов в ряду 6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов в качестве модели окисления гомологов «Триазавирина».
5. Исследовано замещение сульфонильного фрагмента в 2-метилсульфонил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-оне биогенными S-нуклеофилами.
6. Разработаны методы N-алкилирования 2-R-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов для получения аналогов неприродных нуклеозидов.
7. Разработаны методы замещения нитрогруппы в 2-R-4-R'-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онах.
8. Выявлены структурные фрагменты «Триазавирина» существенные для его противовирусной активности.
9. Установлено ингибирующее действие «Триазавирина» на протеин дисульфидизомеразу.
10. Среди синтезированных аналогов «Триазавирина» выявлены новые активные противовирусные соединения.

Основное содержание работы отражено в следующих публикациях:

Публикации в научных журналах, определенных ВАК:

1. Медведева Н. Р. Фторсодержащие [1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидины и [1,2,4]триазоло[5,1-с][1,2,4]триазины / Е.Н. Уломский, Н.Р. Медведева, А.В. Щепочкин, О.С. Ельцов, В.Л. Русинов, О.Н. Чупахин, Э.Г. Деева, О.И. Киселев // ХГС. 2011. № 9. С. 1411-1417 (0,5 п.л./0,2 п.л.).
2. Медведева Н.Р. Алкилирование 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин(4Н)-7-она и взаимодействие продуктов с N-нуклеофилами / О.Н. Чупахин, В.Л. Русинов, Е.Н. Уломский, Н. Р. Медведева, И.М. Сапожникова // Бутлеровские сообщения. 2012. № 9. С. 43-50 (0,5 п.л./0,2 п.л.).

Патенты:

3. Пат. № 2404182 Российская Федерация. Натриевая соль 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она дигидрат / О.Н. Чупахин, В.Л. Русинов, Е.Н. Уломский, В.Н. Чарушин, Н.Р. Медведева, О.И. Киселев, Э.Г. Деева, С.Я. Логинова, С.В. Борисевич, В.П. Бондарев; опубл. 20.01.2010.
4. Пат. № 2402552 Российская Федерация. Натриевая соль 2-н-пропилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она дигидрат и натриевая соль 2-н-бутилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4- триазин-7-она дигидрат / О.Н. Чупахин, В.Л. Русинов, Е.Н. Уломский, В.Н. Чарушин, Н.Р. Медведева, О.И. Киселев, Э.Г. Деева, О.Г. Синяшин, В.А. Мамедов; опубл. 27.06.2010.
5. Пат. № 2455304 Российская Федерация. 6-(2'-Амино-2'-карбоксиэтилтио)-2-метилтио-4-пивалоилоксиметил-1,2,4-триазоло[5,1-с]1,2,4-триазин-7(4н)-он / В.Л. Русинов, О.Н. Чупахин, В.Н. Чарушин, Е.Н. Уломский, Н.Р. Медведева, О.И. Киселев, Э.Г. Деева; опубл. 10.07.2012.
6. Пат. № 2493158 Российская Федерация. Натриевая соль 2-метил-6-фтор-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7(4Н)-она дигидрат, обладающая противовирусным

действием / О.Н. Чупахин, В.Л. Русинов, Е.Н. Уломский, Н.Р. Медведева, О.И. Киселев, Э.Г. Деева, О.Г. Синяшин, В.А. Мамедов; опубл. 20.09.2013.

Другие публикации:

7. Медведева Н.Р. Синтез 2-алкилсульфонил[5,1-с]триазинов и нуклеофильное замещение / Н.Р. Медведева, Е.Н. Уломский, В.Л. Русинов // XI Молодёжная школа по органической химии: тез. докл. – Екатеринбург, 2008. С. 437-438 (0,3 п.л./0,1 п.л.).
8. Медведева Н.Р. Синтез фторсодержащих 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинов и 1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]-триазинов / Н.Р. Медведева, А.В. Щепочкин, Е.Н. Уломский, В.Л. Русинов // XII Молодёжная школа по органической химии: тез. докл. – Иваново, 2009. С. 315-316 (0,3 п.л./0,1 п.л.).
9. Medvedeva N.R. Fluorocontaining Triazoloazines as a structural analogs of 5-Fluorouracil / E.N. Ulomskiy, O.N. Chupakhin, V.L. Rusinov, N.R. Medvedeva, A.V. Shepochkin, S.L. Deev, T.S. Shestakova // 16th European Symposium on Organic Chemistry: abstract.-Prague, Czech Republic, 2009. P. 570 (0,1 п.л./0,03 п.л.).
10. Медведева Н.Р. Азоилтриазены в синтезе триазолотриазинов / Н.Р. Медведева, Е.Н. Уломский, В.Л. Русинов, О.Н. Чупахин // XIII Молодёжная школа-конференция «Актуальные проблемы органической химии»: тез. докл. – Новосибирск, 2010. С. 142 (0,1 п.л./0,03 п.л.).
11. 5-Aminotetrazoles in the synthesis of 6-R-5,5-diamino-1,2,4-triazines / E.N. Ulomskiy, O.N. Chupakhin, V.L. Rusinov, S.L. Deev, T.S. Shestakova, N.R. Medvedeva // 18th International Conference on Organic Synthesis: abstract - Bergen, Norway, 2010. P. 362 (0,1 п.л./0,03 п.л.).
12. Медведева Н.Р. Региоселективность в реакции алкилирования 6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов / И.М. Сапожникова, Н.Р. Медведева, Е.Н. Уломский, В.Л. Русинов // XIV Молодежная школа-конференция по органической химии: тез. докл. – Екатеринбург, 2011. С. 472 (0,1 п.л./0,03 п.л.).
13. Медведева Н.Р. Нуклеофильное замещение в 2-метилсульфонил-4-алкил-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов / И.М. Сапожникова, Н.Р. Медведева, Е.Н. Уломский, В.Л. Русинов // XV Молодежная школа-конференция по органической химии: тез. докл. – Уфа, 2012. С. 227 (0,1 п.л./0,03 п.л.).
14. Медведева Н.Р. Окисление 2-алкилтио-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазинов с последующим нуклеофильным замещением / И.М. Сапожникова, Н.Р. Медведева, Е.Н. Уломский, В.Л. Русинов // Всероссийская конференция «Органический синтез: химия и технология»: тез. докл. – Екатеринбург, 2012. С. 98 (0,1 п.л./0,03 п.л.).
15. Медведева Н.Р. Исследование окислительно-восстановительных превращений 6-нитроазоло[5,1-с][1,2,4]триазиной-потенциальных противовирусных препаратов / А.В. Иванова, А.Н. Козицина, Т.Н. Митрофанова, Н.Р. Медведева, Е.Н. Уломский, В.Л. Русинов // IX Всероссийская конференция «Химия и медицина» с Молодежной научной школой по органической химии: тез. докл. – Уфа, 2013. С. 181 (0,1 п.л./0,03 п.л.).
16. Медведева Н.Р. Окисление «Триазавирина» и его аналогов как возможное превращение под действием оксидаз / Н.Р. Медведева, И.М. Сапожникова, Е.Н. Уломский, В.Л. Русинов // IX Всероссийская конференция «Химия и медицина» с Молодежной научной школой по органической химии: тез. докл. – Уфа, 2013. С. 276 (0,1 п.л./0,03 п.л.).
17. Medvedeva N. Oxidation of 2-alkylthio-1,2,4-triazolo[5,1-с][1,2,4]triazines and study of the reaction products with nucleophiles / N. Medvedeva, I. Sapozhnikova, E. Ulomskiy, V. Rusinov, O. Chupakhin // 18th European Symposium on Organic Chemistry: abstract - Marseille, France, 2013. P. P2-060, 56 (0,1 п.л./0,03 п.л.).
18. Медведева Н.Р. Моделирование потенциального взаимодействия «Триазавирина» и его аналогов с цистеинсодержащими белками. 1. Замещение нитрогруппы цистеином / И.М. Сапожникова, Н.Р. Медведева, Е.Н. Уломский, В.Л. Русинов // Уральский

- научный форум «Современные проблемы органической химии»: тез. докл. – Екатеринбург, 2014. С. 198 (0,1 п.л./0,03 п.л.).
19. Медведева Н.Р. Моделирование потенциального взаимодействия «Триазавирина» и его аналогов с цистеинсодержащими белками. 2. Замещение нитрогруппы глутатионом / Н.Р. Медведева, И.М. Сапожникова, Е.Н. Уломский, В.Л. Русинов // Уральский научный форум «Современные проблемы органической химии»: тез. докл. – Екатеринбург, 2014. С. 172 (0,1 п.л./0,03 п.л.).